



24736

①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ Off nl gungsschrift
⑩ DE 197 54 978 A 1

②① Aktenzeichen: 197 54 978.0
②② Anmeldetag: 11. 12. 97
②③ Offenlegungstag: 1. 7. 99

⑤① Int. Cl.⁶:
G 01 N 27/62
B 01 L 3/00
G 01 N 1/28
G 01 N 33/48
B 01 L 3/02
H 01 J 49/02
// G 01 N 35/10,33/50

DE 197 54 978 A 1

⑦① Anmelder:
Bruker Daltonik GmbH, 28359 Bremen, DE

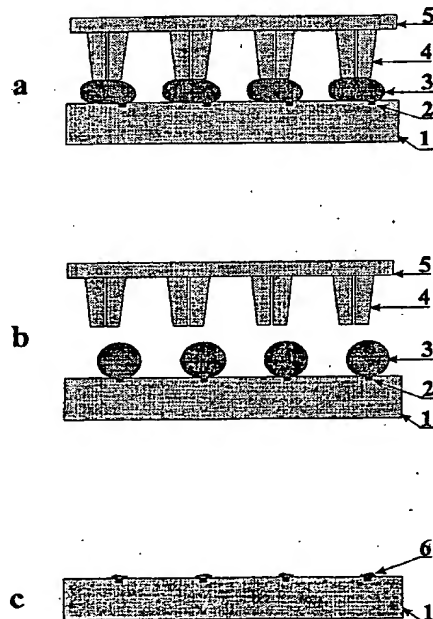
⑦② Erfinder:
Erfinder wird später genannt werden

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤④ Probenträger für die MALDI-Massenspektrometrie nebst Verfahren zur Herstellung der Platten und zum Aufbringen der Proben

⑤⑦ Die Erfindung betrifft Probenträger für die massenspektrometrische Analyse von Biomolekülen, Verfahren zur Herstellung der Probenträger und Verfahren zum Beladen der Probenträger mit Proben der Biomoleküle aus vorwiegend wäßrigen Lösungen zusammen mit Matrixsubstanz für die Ionisierung der Substanzen durch matrixunterstützte Laserdesorption (MALDI). Die Erfindung besteht darin, die Oberfläche der Probenträger stark flüssigkeitsabweisend (hydrophob) zu machen, wodurch beim Eintrocknen der Probentropfchen zu Probenflecken eine Struktur der MALDI-Matrixkristalle erzwungen wird, die für eine effektive Ionisierung günstig ist. Durch winzige, benetzungsfreundliche (hydrophile) Ankerbereiche für die Probentropfchen in dieser hydrophoben Umgebung wird der Pipettiervorgang sehr erleichtert und es können die Probenflecke auf dem Probenträger sehr genau lokalisiert werden. Beim Aufpipettieren von Probentropfchen ziehen sich diese auch bei leicht ungenauer Auftragung auf die hydrophilen Ankerbereiche zurück und trocknen dort unter Bildung eines monolithischen Kristallkonglomerats ein, das günstige Eigenschaften für den MALDI-Prozeß besitzt. Das Verfahren kann insbesondere für die Oligonukleotid-Analyse mit 3-Hydroxypicolinsäure (3-HPA) als Matrix, aber auch für andere MALDI-Präparationslösungen von Biomolekülen verwendet werden.



Beschreibung

Die Erfindung betrifft Proben-träger für die massenspek-
tometrische Analyse von Biomolekülen, Verfahren zur
Herstellung der Proben-träger und Verfahren zum Beladen
der Proben-träger mit Proben der Biomoleküle aus vorwie-
gend wäßrigen Lösungen zusammen mit Matrixsubstanz für
die Ionisierung der Substanzen durch matrix-unterstützte
Laserdesorption (MALDI).

Die Erfindung besteht darin, die Oberfläche der Proben-
träger stark flüssigkeitsabweisend (hydrophob) zu machen,
wodurch beim Eintrocknen der Proben-tröpfchen zu Proben-
flecken eine Struktur der MALDI-Matrixkristalle erzwin-
gen wird, die für eine effektive Ionisierung günstig ist.
Durch winzige, benetzungsfreundliche (hydrophile) Anker-
bereiche für die Proben-tröpfchen in dieser hydrophoben
Umgebung wird der Pipettiervorgang sehr erleichtert und es
können die Probenflecke auf der Proben-träger sehr genau lo-
kalisiert werden. Beim Aufpipettieren von Proben-tröpfchen
ziehen sich diese auch bei leicht ungenauer Auftragung auf
die hydrophilen Ankerbereiche zurück und trocknen dort
unter Bildung eines monolithischen Kristallkonglomerats ein,
das günstige Eigenschaften für den MALDI-Prozess besitzt.
Das Verfahren kann insbesondere für die Oligonukleotid-
Analyse mit 3-Hydroxypicolinsäure (3-HPA) als Matrix,
aber auch für andere MALDI-Präparationslösungen von
Biomolekülen verwendet werden.

Stand der Technik

Für die Analyse von Biomolekülen hat sich die Massen-
spektrometrie mit Ionisierung durch matrix-unterstützte La-
serdesorption und Ionisierung (MALDI) als ein Standard-
verfahren etabliert. Meist werden dazu Flugzeitmassenspek-
trometer (TOF-MS = time-of-flight mass spectrometer) ver-
wendet, aber auch Ionenzyklotron-Resonanzspektrometer
(FT-ICR = Fourier-transform ion cyclotron resonance) oder
Hochfrequenz-Quadrupol-Ionenfallenmassenspektrometer
können hier eingesetzt werden. Die Biomoleküle befinden
sich in aller Regel in wäßriger Lösung. Im folgenden wer-
den die Biosubstanzen, deren Moleküle untersucht werden
sollen, auch "Analyt" genannt.

Unter Biomolekülen sollen hier besonders die Oligonu-
kleotide (also das Genmaterial in seinen verschiedenen Aus-
formungen wie DNA oder RNA) und Proteine (also die we-
sentlichen Bausteine der lebenden Welt) verstanden werden,
einschließlich ihrer besonderen Analoge und Konjugate,
wie beispielsweise Glycoproteine oder Lipoproteine.

Die Auswahl der Matrixsubstanz für MALDI hängt von
der Art der Biomoleküle ab; es sind inzwischen weit über
hundert verschiedene Matrixsubstanzen bekannt geworden.
Die Matrixsubstanz hat unter anderem die Aufgabe, die Pro-
benmoleküle möglichst einzeln festzuhalten, am Proben-trä-
ger anzubinden, während des Laserschusses durch Bildung
einer Dampfwolke ohne Zerstörung der Biomoleküle und
möglichst ohne Anlagerung der Matrixmoleküle in die Gas-
phase zu übertragen, und schließlich dort unter Protonierung
oder Deprotonierung zu ionisieren. Für diese Aufgabe hat es
sich als günstig erwiesen, die Analytmoleküle in irgendeiner
Art in die zumeist kristallinen Matrices bei deren Kristalli-
sation oder zumindest in die Grenzflächen zwischen den
Kriställchen einzubauen.

Für das Auftragen von Probe und Matrix sind eine Reihe
verschiedener Methoden bekannt geworden. Die einfachste
davon ist das Aufpipettieren einer Lösung mit Probe und
Matrix auf einen gereinigten, metallischen Proben-träger.
Der Lösungstropfen bildet auf der Metalloberfläche eine Be-
netzungsfläche, deren Größe in etwa dem Tropfendurchmes-

ser entspricht und von der Hydrophilität der Metalloberflä-
che und den Eigenschaften des Tröpfchens abhängt. Es bil-
det sich dabei nach dem Auftrocknen der Lösung ein Proben-
fleck aus kleinen Matrixkriställchen in der Größe dieser
Benetzungsfläche, wobei sich in der Regel aber keine
gleichmäßige Belegung der Benetzungsfläche zeigt. Die
Kriställchen der Matrix beginnen in wäßrigen Lösungen in
der Regel am Rand der Benetzung der Metallplatte mit dem
Proben-tröpfchen zu wachsen. Sie wachsen zum Inneren der
Benetzungsfläche hin. Häufig bilden sie strahlenartige Kri-
stalle, wie zum Beispiel bei 5-Dihydroxybenzoesäure oder
3-Hydroxypicolinsäure, die sich zum Inneren des Flecks hin
von der Trägerplatte abheben. Das Zentrum des Flecks ist
häufig leer oder mit feinen Kriställchen bedeckt, die aber
wegen ihrer hohen Konzentration an Alkalisalzen kaum für
die MALDI-Ionisierung brauchbar sind. Die Beladung mit
Analytmolekülen ist sehr ungleichmäßig. Diese Belegungs-
art erfordert daher eine visuelle Betrachtung der Proben-trä-
geroberfläche durch ein Videomikroskop, das an allen kom-
merziell hergestellten Massenspektrometern für diese Art
von Analysen zu finden ist. Ionenausschüttung und Massenauf-
lösung schwanken im Probenfleck von Ort zu Ort. Es ist oft
ein mühsamer Vorgang, eine günstige Stelle des Proben-
flecks mit guter Analytioneausbeute und guter Massenauf-
lösung zu finden, und nur Erfahrung und Ausprobieren hilft
hier bisher weiter.

Für Matrixsubstanzen, die sich nur sehr schwer oder gar
nicht in Wasser lösen, wie beispielsweise α -Cyano-4-Hy-
droxy-Zimtsäure, hat es sich als günstig erwiesen, eine sehr
dünne Schicht der Kristalle auf der Oberfläche vor dem Auf-
bringen der wäßrigen Analytlösungen zu erzeugen, bei-
spielsweise durch Aufbringen einer Lösung der Matrixsub-
stanz in Azeton. Diese Art der MALDI-Belegung ist bei
Peptiden sehr erfolgreich (O. Vorm et al., J. Am. Soc. Mass
Spectrom., 5, (1994), 955). Die Belegung zeigt insbeson-
dere eine ortsunabhängige Empfindlichkeit im Probenfleck,
eine Grundvoraussetzung für jede automatisch auszufüh-
rende Analyse. Leider kann man diese Art der homogenen
Präparation für wasserlösliche Matrices nicht anwenden,
beispielsweise nicht für Oligonukleotide, für die sich bisher
3-Hydroxypicolinsäure (3-HPA) in wäßriger Lösung als
günstigste Matrix erwiesen hat. Diese Matrix zeigt aber die
oben beschriebenen Randeffekte in extremer Weise.

Für Oligonukleotide ist eine günstige Methode des Pro-
benauftrags bekannt geworden, die jedoch auf Siliziumchips
beschränkt ist. Die an der Oberfläche des Chips gebundenen
Oligonukleotide werden mit einer piezobetriebenen Mikro-
pipette mit Mikrotröpfchen einer Matrixlösung (3-HPA) von
nur einigen Hundert Picolitern beschossen, wodurch eine
Kristallstruktur mit gleichmäßiger MALDI-Empfindlichkeit
erzeugt wird (D. Little et al., Vortrag auf der 45. ASMS Con-
ference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Palm
Springs, 2. bis 5. Juni 1997).

Wie in Patent DE 196 28 178 beschrieben, kann man in
Pipettenrobotern auf einem Proben-träger viele Probenflek-
ken in hoher Dichte mit Hilfe von Vielfachpipetten durch
mehrmaligen Übertrag der Proben aus Mikrotiterplatten auf-
tragen. Dabei hängt aber die Ortsgenauigkeit der Proben-
flecken von der Präzision des Probenroboters ab. Die kom-
merziell erhältlichen Probenroboter haben aber nur eine me-
chanische Präzision von bestenfalls 200 Mikrometern.
Diese Auftragung führt ohne besondere Präparationstechnik
zu den oben beschriebenen unregelmäßigen Probenflecken.

Auch die in den Patentanmeldungen DE 196 17 011 und
DE 196 18 032 angegebenen Verfahren der MALDI-Technik
unter Verwendung von Zellulosenitrat haben sich bis-
her für wasserlösliche Matrices und insbesondere für Oligo-
nukleotide nicht bewährt.

Aber selbst bei Aufbringen sehr kleiner Probeflecke reproduzierbarer Empfindlichkeit ist es ein mühsames Unterfangen, die Koordinaten der Probenflecken im Massenspektrometer allein mit massenspektrometrischen Mitteln ohne weitere Hilfsvorrichtungen genau festzustellen, wenn sie ortsgenau aufgebracht wurden. Gerade für einen hohen Probendurchsatz ist es daher höchst wünschenswert, die Orte der Probenflecken vor der Analyse möglichst genau zu kennen. Nur dann ist ein schnelles und automatisches Arbeiten, das heißt, ein Arbeiten ohne ständige Kontrollmessungen möglich. Besonders vorteilhaft wäre ein Aufbringen der Probenflecke in einem präzisen Raster.

Für einen hohen Probendurchsatz der Analyse ist eine Automatisierbarkeit aller Analysenschritte einschließlich der Vorbereitung der Proben notwendig. Während die Probenvorbereitung in Pipettierautomaten heute schon sehr gut automatisch ablaufen kann, steht die Heterogenität der MALDI-Präparationen mit wasserlöslichen Matrices und das ortsgenaue Auftragen der Probenflecke einer Automatisierbarkeit der massenspektrometrischen Messung noch stark entgegen.

Aufgabe der Erfindung

Es ist die Aufgabe der Erfindung, einen Probenträger zu finden, der besondere Eigenschaften für eine Automatisierbarkeit der massenspektrometrischen Analyse aufweist. Es sollen die aufpipettierten Tröpfchen der Probenlösung für die MALDI-Präparation von Biomolekülen so eintrocknen, daß die erzeugten Probenflecken eine gute und vor allem reproduzierbare Ionisierungsausbeute des MALDI-Verfahrens ergeben. Die getrockneten Probenflecken sollen auf dem Probenträger in einem präzisen Raster angeordnet sein, auch wenn die Tröpfchen mit einem wenig präzise arbeitenden Pipettenroboter aufgebracht werden. Es sollen Verfahren zur günstigen Herstellung solcher Probenträger und zum Beladen der Platten mit Proben gefunden werden.

Erfindungsgedanke

Es ist der Grundgedanke der Erfindung, die Probenträger an ihrer Oberfläche stark flüssigkeitsabweisend für die Probenlösung zu machen, für wässrige Lösungen also stark hydrophob. Wird auf diese Oberfläche ein Probentropfen aufgebracht, das Analyt und Matrix gelöst enthält, so ergibt sich überraschend ein völlig anderes Kristallisationsverhalten im Tröpfchen, als von bisherigen Präparationen gewohnt. Der auf der hydrophoben Oberfläche ohne erkennbare Benetzung der Oberfläche aufsitzende Tropfen zieht sich beim Eintrocknen stark zusammen, eventuell im Inneren gebildete Kriställchen werden dabei durch die Kraft der Oberflächenspannung auf ein minimales Volumen zusammengeschoben. Im letzten Moment des Eintrocknens findet, wie unter dem Mikroskop zu beobachten ist, eine ruckartige Auskristallisation statt, anscheinend mit einem Füllen der Lücken zwischen den schon gebildeten Kriställchen; es entsteht dabei ein monolithischer Brocken mit einem mikrokristallinen Gefüge im Zentrum des Bereichs, den das Tröpfchen eingenommen hatte.

Dieser monolithische Brocken zeigt überraschenderweise eine sehr gute und von Brocken zu Brocken reproduzierbare Ionisierung der eingebrachten Biomoleküle, mindestens gleich gut wie die mit Mühe gesuchten günstigsten Stellen der bisherigen Präparationen. Wahrscheinlich sind die Biomoleküle in einer für den Desorptions- und Ionisationsprozeß sehr günstigen Lage an den Korngrenzen der mikrokristallinen Gefügestruktur eingebettet.

Aus einem Tröpfchen von 500 Nanoliter Volumen, das ei-

nen Durchmesser von einem Millimeter hat, wird ein kleiner, flacher Block von etwa 200 Mikrometer Durchmesser. Dieser Durchmesser entspricht etwa dem der üblicherweise benutzten Fokussflächen des Laserlichtstrahles. Der monolithische Brocken ist auf der hydrophoben Unterlage festgeklebt, jedoch ist diese Bindung nicht sehr fest. Die eingesetzte Probenmenge kann ohne Einbußen an Signal stark reduziert werden. Eine klassische Präparation auf hydrophilen Flächen würde hier einen Fleckdurchmesser von mindestens einem Millimeter ergeben.

Es ist allerdings schwierig, die Tröpfchen mit einer Pipette auf die hydrophobe Oberfläche aufzupipettieren. Das Tröpfchen hat die Tendenz, an der Pipettenspitze kleben zu bleiben, obwohl die Pipettenspitze in der Regel ebenfalls aus einem hydrophoben Material besteht. Ein gezieltes Ablagern des Tröpfchens auf der Oberfläche gelingt kaum.

Es ist daher ein weiterer Grundgedanke der Erfindung, die Oberfläche des Probenträgers im gewünschten Raster der Probenflecke mit winzig kleinen, benetzungsfreundlichen (hydrophilen) Ankerbereichen für die Probentropfen zu versehen. Der Durchmesser dieser Ankerbereiche soll etwa ein Zehntel des Durchmessers der aufpipettierten Tröpfchen messen, ein günstiger Bereich liegt zwischen einem Viertel und einem Zwanzigstel des Durchmessers der aufzubringenden Probentropfen. Die aufpipettierten Tröpfchen mit gelösten Analytmolekülen hängen sich an diese winzigen Ankerbereiche an. Die Pipette läßt sich abheben, ohne das Tröpfchen wieder mitzunehmen. Selbst bei leicht seitlich verrutschtem Aufbringen der Pipetten steht das Tröpfchen nach dem Lösen von der Pipette als Kugel exakt über dem hydrophilen Ankerbereich und trocknet dort zu dem monolithischen Mikrokristallkonglomerat ein. Es muß dabei nur durch leichtes Aufpressen der Tröpfchen eine Überlappung der aufgetragenen Tröpfchen mit den hydrophilen Ankerbereichen gegeben sein. Die hydrophilen Ankerbereiche sollten kleiner sein, als es dem Durchmesser der schließlich gebildeten Kristallkonglomerate entspricht. Es ist ein weiterer Vorteil dieser hydrophilen Ankerbereiche, daß dort die Kristallkonglomerate recht fest an die Oberfläche des Probenträgers binden.

Insgesamt wird durch die reproduzierbare Ionenausbeute und hohe Empfindlichkeit, durch die Ortspräzision der Probenaufbringung und durch die festsitzenden Probenflecke eine Automatisierbarkeit der Analyse erreicht. Beschreibung der Bilder

Fig. 1 zeigt eine Folge a, b und c von schematischen Darstellungen zum Aufbringen der Probentropfen (3) auf den Probenträger (1) aus den Pipettenspitzen (4) einer Vielfachpipette (5) mit nachfolgendem Eintrocknen.

(a) Die Pipetten haben die Lösungströpfchen (3) aus ihrer Spitze (4) ausgedrückt, die Tröpfchen (3) sind zwischen Pipettenspitzen (4) und Probenträger (1) platgedrückt. Dadurch erreichen die Tröpfchen ihre hydrophilen Ankerbereiche (2), auch wenn die Pipettenspitzen (4) nicht genau über dem Ankerbereich (2) stehen, und benetzen dort den Probenträger (1).

(b) Die Pipettenspitzen (4) sind abgehoben, die Tröpfchen (3) haben die Form einer Kugel angenommen und stehen genau über ihren hydrophilen Ankerbereichen (2).

(c) Die Probentropfen sind eingetrocknet und hinterlassen kleine, monolithische Blöcke (6) genauer Ortsausrichtung mit mikrokristallinem Gefüge auf dem Probenträger (1).

Besonders günstige Ausführungsformen

Es soll hier unter einer "hydrophoben" Oberfläche eine benetzungsfeindliche und flüssigkeitsabweisende Oberfläche für die benutzte Probenflüssigkeit verstanden werden, auch wenn es sich dabei (ausnahmsweise) nicht um eine wäßrige Probenlösung handeln sollte. Im Falle einer öligen Probenlösung soll es sich also entsprechend um eine lipophobe Oberfläche handeln. In der Regel lösen sich jedoch die Biomoleküle am besten in Wasser, manchmal unter Zugabe von organischen, wasserlöslichen Lösungsmitteln.

Entsprechend soll unter einer "hydrophilen" Fläche eine benetzungsfreundliche Fläche für die Art der benutzten Probenflüssigkeit gemeint sein, auch wenn es sich dabei nicht um eine wäßrige Lösung handeln sollte.

Die Hydrophobizität kann im Prinzip aus dem Anstellwinkel ermittelt werden, den die Flüssigkeit unter normierten Bedingungen am Rande der Benetzungsfläche mit der festen Oberfläche ausbildet. Für Tröpfchen auf einer stark hydrophoben Oberfläche gibt es aber den Fall, daß sich überhaupt keine Benetzungsfläche ausbildet und es daher auch keinen Anstellwinkel gibt, wie es zum Beispiel für Quecksilbertropfen auf einer Glas- oder Holzplatte zu finden ist.

Die Oberflächen bisher verwendeter metallischer Probenträger sind in der Regel von Natur aus leicht hydrophil gegenüber den wäßrigen Probenlösungen, ein Probentropfen fließt normalerweise etwas auseinander. Die Hydrophilität wird durch die Hydroxygruppen erzeugt die sich unter der Einwirkung von feuchter Luft auf jedem Metall (selbst auf Edelmetallen) bilden.

Um hydrophobe Oberflächen der Probenträger zu erhalten, kann die ganze Probenträger aus einem hydrophoben Material gefertigt werden, beispielsweise aus Teflon®, das übrigens sowohl hydrophob wie auch lipophob ist. Es ist aber dann dafür zu sorgen, daß die Oberfläche (beispielsweise durch Einlagerung von Graphit) elektrisch leitend wird, da der MALDI-Prozeß für die gleichmäßige Beschleunigung der gebildeten Ionen einerseits ein homogenes elektrisches Feld und andererseits eine Ableitung von Ladungen braucht, deren Polarität zu der der gebildeten Ionen entgegengesetzt ist. Auch eine reine Graphitoberfläche ist sehr hydrophob.

Es ist aus Gründen einfacher Herstellung durchaus zweckmäßig, bei Probenträgern aus Metall oder metallisiertem Kunststoff zu bleiben, jedoch die Oberfläche hydrophob zu machen. Das kann beispielsweise durch einen hauchdünnen, hydrophoben Lack geschehen, oder aber durch Aufkleben einer dünnen, hydrophoben Folie, beispielsweise aus Teflon®. Noch zweckmäßiger ist es aber, die Metalloberfläche durch eine monomolekulare, chemische Veränderung hydrophob zu machen, da dann eine gewisse elektrische Leitfähigkeit, wenn auch hochohmig, erhalten bleibt.

Eine solche Hydrophobisierung einer Metalloberfläche ist an sich bekannt. Dazu werden in der Regel längere Alkanketten (beispielsweise lineare C₁₈-Ketten) über eine Schwefelbrücke kovalent an die Atome der Metalloberfläche gebunden. Diese Bindung ist außerordentlich fest, sie kann mit normalen Mitteln nicht abgewaschen werden. Sie hält einer jahrelangen Bewitterung stand. Noch hydrophobere Oberflächen werden erhalten, wenn die Wasserstoffatome an den Enden der Alkanketten durch Fluoratomer ersetzt werden. Es gibt jedoch viele andere, äquivalente Methoden der Hydrophobisierung, zum Beispiel unter Verwendung von Silikon, Alkylchlorosilanen oder zinnorganischen Verbindungen.

Der Vorteil einer so präparierten Oberfläche liegt auch darin, daß Metall- und Alkaliionen nicht mehr durch die in

der Regel sauren Matrixlösungen von der Metalloberfläche abgelöst werden und sich beim MALDI-Prozeß als Addukte an die Biomoleküle anlagern können.

Die Herstellung einer dichten Schicht von solchen Alkanketten auf der Metalloberfläche ist im Prinzip sehr einfach. Es werden dazu die entsprechenden Alkanthiole (Alkanhydrogensulfide) zunächst im Methanol gelöst. Die Metallplatten werden dann senkrecht in ein Wasserbad getaucht. Gibt man nun einen Tropfen der methanolischen Lösung der Alkanthiole ins Wasser, so sammeln sich die Alkanthiole in geordneter Formation an der Oberfläche des Wassers. Alle Moleküle sind in sehr enger Anordnung parallel ausgerichtet. Die hydrophoben Alkanenden befinden sich an der Oberfläche des Wasserbades, die hydrophilen Thiolgruppen weisen ins Innere des Wassers. Zieht man nun die Metallplatte vorsichtig aus dem Wasser heraus, so wandert die geschlossene Formation der Alkanthiole an die Oberfläche der Metallplatte und geht dort unter Wahrung der parallelen Orientierung eine kovalente Bindung der Einzelmoleküle mit Metallatomen der Oberfläche unter Bildung von Metallthiolaten ein. Die Belegung ist außerordentlich dicht.

Die hydrophilen Ankerbereiche für die Probentropfen können auf vielerlei Weise erzeugt werden. Ein Beispiel ist das Abdecken der gewünschten Ankerbereiche vor der Hydrophobisierung mit einem abwaschbaren oder hydrophilen Lack. Um genügend kleine Punkte zu erhalten, kann der Decklack in Form kleinster Tröpfchen mit einer piezobetriebenen Tröpfchenpipette nach Art der Tintenstrahl-Drucker aufgeschossen werden. Es ist damit eine außerordentlich gute Ortspräzision der Lackpunkte erreichbar. Nach der Hydrophobisierung können die Lackpunkte einfach abgewaschen werden, sofern sie nicht schon als solche genügend gute hydrophile Anker bilden. Die gewaschenen Ankerbereiche können auch mit besonderen Hydrophilisierungsmitteln besonders hydrophil gemacht werden.

Es können solche hydrophilen Lacktröpfchen aber auch nachträglich auf der hydrophoben Oberfläche aufgedruckt werden. Dazu eignen sich besonders amphiphile Substanzen, die auf der hydrophoben Oberfläche binden und eine hydrophile Oberfläche bilden.

Die hydrophilen Ankerbereiche können aber auch in sehr einfacher Weise durch Zerstörung der hydrophoben Schicht erzeugt werden. Das kann durch Aufdrucken (beispielsweise wieder nach Art der Tintenstrahl-Drucker) von chemisch verändernden oder enzymatisch abbauenden Substanzlösungen geschehen, durch Zerstören mit glühenden Brennspitzen, aber auch durch Ablation von Oberflächenmaterial, beispielsweise durch Funkenerosion oder Laserbeschuß.

Bei langer Lagerung können sich die hydrophilen Ankerbereiche leicht mit hydrophoben Molekülen aus der Umgebungsluft belegen. Es kann daher zweckmäßig sein, die hydrophilen Ankerbereiche bereits kurz nach ihrer Herstellung mit einer dünnen Kristallschicht aus der MALDI-Matrixsubstanz zu belegen. Dazu kann die Oberfläche der metallischen Probenträger kurzzeitig in eine verdünnte Lösung der Matrixsubstanz eingetaucht werden. Nach dem Herausheben bleibt in jeder hydrophilen Ankerbereich ein genau dosiertes Tröpfchen zurück. Das Eintrocknen dieser Tröpfchen ergibt die erwünschten Kristallschichten.

Die Probentropfen werden normalerweise mit Pipetten auf den Probenträger aufgebracht, wie schematisch in Fig. 1 gezeigt. Für das gleichzeitige Aufbringen vieler Probentropfen aus Mikrotiterplatten werden Vielfachpipetten verwendet, die von Pipettenrobotern in Pipettenautomaten bewegt werden. Es ist daher günstig, Probenträger in der Größe von Mikrotiterplatten zu verwenden und das Raster der hydrophilen Ankerbereiche an das Raster der Mikrotiterplatten anzupassen. Es ist weiterhin günstig, wenn die

Probenräger auch die Form von Mikrotiterplatten haben, da sie dann von den handelsüblichen Pipettenrobotern bearbeitet werden können. Da auf dem Probenräger eine wesentlich höhere Probenkonzentration erreicht werden kann, als es in Mikrotiterplatten möglich ist, kann das Raster auf dem Probenräger viel feiner sein, als es dem Raster der Mikrotiterplatte entspricht. Es kann beispielsweise durch Teilung des Rasters der Mikrotiterplatten erhalten werden. Es können dann auf einen Probenräger die Proben aus mehreren Mikrotiterplatten aufgebracht werden. Das Grundmuster der Ur-Mikrotiterplatte besteht aus 96 kleinen Gefäßen im Raster von 9 Millimetern in einer Anordnung von 8 Reihen mal 12 Spalten. Die Mikrotiterplatten sind aber ohne Veränderung ihrer Größe weiterentwickelt worden, moderne Ausführungsformen zeigen 384 oder sogar 1536 Mikrogefäße im Raster von 4,5 und 2,25 Millimetern.

Die horizontale Ortsgenauigkeit für die Positionierung der Vielfachpipetten über dem horizontal liegenden Probenräger ist auf etwa 200 Mikrometer beschränkt. Die vertikale Ortsgenauigkeit kann leicht durch seitliche Auflageflächen der Vielfachpipetten und Anschlagsbolzen auf etwa 50 Mikrometer verbessert werden.

Die Aufgabe der Tröpfchen erfolgt zweckmäßigerweise, wenn sich die Vielfachpipette im Abstand von 500 Mikrometer über dem Probenräger befindet. Es werden etwa 500 Nanoliter der Probenlösung aus jeder Pipettenspitze der Vielfachpipette auf den Probenräger pipettiert, wie schematisch in Fig. 1 gezeigt. Gewöhnlich ist die Menge der Probenlösung in der Pipettenspitze durch ein Gasbläschen abgeschlossen, daher ist im Kanal der Pipettenspitze anschließend keine Lösung mehr vorhanden und die Kontaktkräfte zur hydrophoben Pipettenspitze sind sehr gering.

Die Tröpfchen, die im entspannten Zustand Kugeln mit einem Durchmesser von einem Millimeter Durchmesser bilden, sind jetzt zwischen der Pipettenspitze und dem Probenräger zusammengedrückt, wie aus Fig. 1a ersichtlich. Selbst bei einer horizontalen Fehljungierung der Pipettenspitzen können die Tröpfchen ihren jeweils zugeordneten hydrophilen Ankerbereich erreichen und sich dort festsetzen. Beim Abheben der Vielfachpipette werden die Tröpfchen auf dem Probenräger verbleiben, da sie dort ihre Anker gebunden haben. Sie stellen sich genau über die Ankerbereiche und nehmen ihre ideal runde Gestalt an, wie in Fig. 1b dargestellt. Beim Eintrocknen hinterlassen die Tröpfchen die Kristallkonglomerate mit den Probenmolekülen exakt auf den hydrophilen Ankerbereichen, wie in Fig. 1c schematisch zu sehen ist. Die brockenförmigen MALDI-Präparate haben daher wie gewünscht eine exakte Positionierung an vorbekannten Stellen, ihre Größe entspricht den Fokusflächen der Laserstrahlen. Sie bieten außerdem eine hohe Ausbeute an Analytionen, und sind somit in idealer Weise für eine automatisch erfolgende Analyse vorbereitet.

Natürlich können die Tröpfchen auch manuell aufgebracht werden, wie es überhaupt viele Verwendungsmöglichkeiten für die hier dargestellten Probenräger gibt, wie es jedem Fachmann auf diesem Gebiet nach diesen Ausführungen einleuchtend sein wird.

Aus Natur und Zielsetzung des Trocknungsvorgangs folgt, daß bestimmte Zusammensetzungen der Probenlösung zu vermeiden sind. So ist eine Beimengung von Tensiden oder Detergenzien schädlich, weil dadurch eine Benetzung der hydrophoben Oberfläche stattfinden kann. Auch eine Beimengung von solchen organischen Lösemitteln, die eine Benetzung hervorrufen, ist zu vermeiden. Auch hier ist es jedem Fachmann nach diesen Ausführungen verständlich, wie er das Verfahren der Probenvorbereitung und des Aufpipettierens vorzunehmen hat, um eine fehlerhafte Probenaufgabe zu vermeiden.

Sowohl hydrophobe wie auch hydrophile Oberflächen können bei langer Lagerung in Umgebungsluft ihre Benetzungseigenschaften durch Belegung der Oberflächen mit Verunreinigungen aus der Luft ändern. Es ist daher zweckmäßig, die gut präparierten Probenräger im Vakuum oder unter Schutzgas zu lagern.

Patentansprüche

1. Probenräger für die massenspektrometrische Analyse von Biomolekülen mit Ionisierung durch matrix-unterstützte Laserdesorption (MALDI), **dadurch gekennzeichnet**, daß die Fläche für das Auftragen der Proben gegenüber der Probenlösung stark flüssigkeitsabweisend (hydrophob) ist.
2. Probenräger nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sich auf der sonst geschlossen hydrophoben Oberfläche winzige benetzungsfreundliche (hydrophile) Ankerbereiche für die aufzubringenden Proben-tröpfchen befinden.
3. Probenräger nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die hydrophilen Ankerbereiche einen Durchmesser haben, der etwa zwischen einem Viertel und einem Zwanzigstel des Durchmessers der aufzubringenden Proben-tröpfchen liegt.
4. Probenräger nach einem der Ansprüche 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß die hydrophilen Ankerbereiche ein Raster bilden, das dem Grundmuster einer Mikrotiterplatte (9 Millimeter) oder einem daraus durch Teilung entstandenen feineren Raster entspricht.
5. Probenräger nach einem der vorhergehenden Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß er Größe und Form einer Mikrotiterplatte hat.
6. Probenräger nach einem der vorhergehenden Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß er aus einem hydrophoben Grundmaterial besteht.
7. Verfahren zur Herstellung eines Probenrägers nach einem der Ansprüche 2 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Probenräger aus elektrisch leitfähigem Material hergestellt, daß danach die Oberfläche hydrophob gemacht wird und daß dann die hydrophilen Ankerbereiche erzeugt werden.
8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Hydrophobie durch eine chemische Veränderung der Oberfläche, durch einen lackartigen Film, durch Aufbringen eines Polymers oder durch eine aufgeklebte dünne Folie erzeugt wird.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 oder 8, dadurch gekennzeichnet, daß die hydrophilen Ankerbereiche durch Aufdrucken erzeugt werden.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 oder 8, dadurch gekennzeichnet, daß die hydrophilen Ankerbereiche durch Zerstören der Hydrophobie der Oberfläche erzeugt werden.
11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Hydrophobie der Oberfläche in den Ankerbereichen durch chemischen oder enzymatischen Abbau, durch Brennstempel, Funkenerosion oder Laserablation zerstört wird.
12. Verfahren zur Herstellung eines Probenrägers nach einem der Ansprüche 2 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Probenräger aus elektrisch leitfähigem Material hergestellt, daß danach die später hydrophilen Ankerbereiche durch Aufdrucken eines abwaschbaren oder bereits hydrophilen Decklackes vor Hydrophobisierung der Oberfläche erzeugt und daß dann die restliche Oberfläche hydrophob gemacht wird.

13. Verfahren zum Aufbringen von Probentröpfchen auf die horizontale Oberfläche eines Probenträgers nach einem der Ansprüche 2 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß ein Probentröpfchen mit einer hydrophoben Pipettenspitze aufgebracht wird, die sich in einem so geringen Abstand über der Oberfläche des Probenträgers befindet, daß das Probentröpfchen zwischen Pipettenspitze und Probenträger plattgedrückt wird und so auch bei auch leichter vertikaler Fehljüstierung der Pipettenspitze den zugeordneten hydrophilen Ankerbereich berührt

14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß mit einer Vielfachpipette viele Probentröpfchen gleichzeitig auf die Oberfläche der Probenträger aufgetragen werden.

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

20

25

30

35

40

45

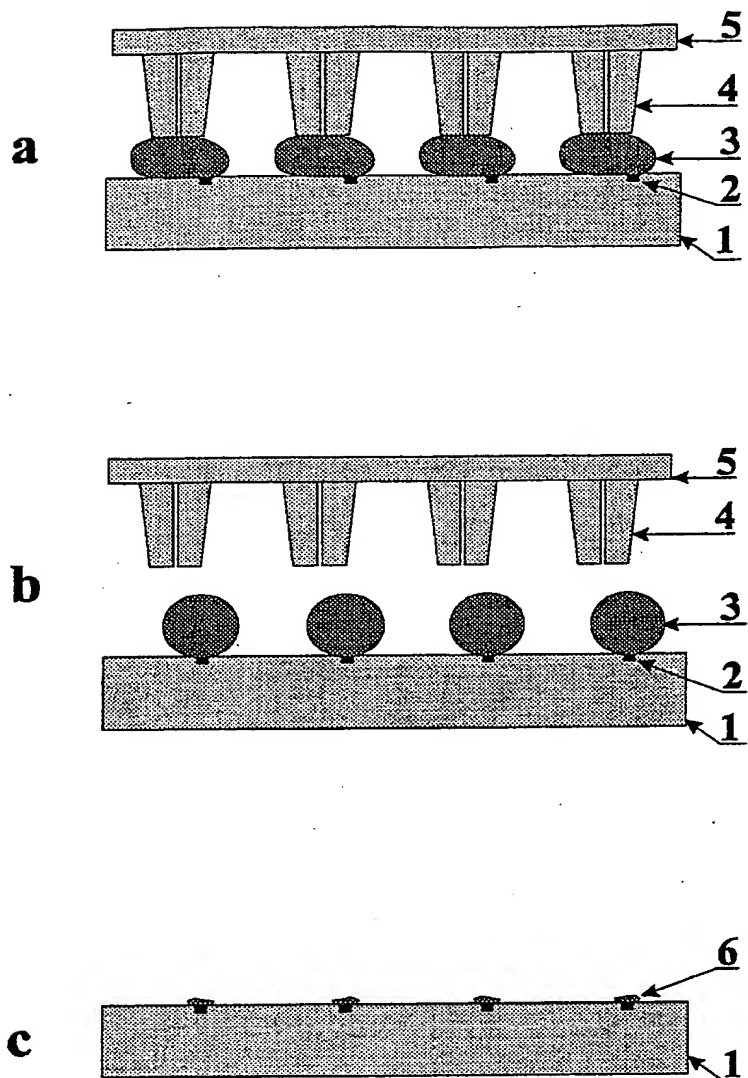
50

55

60

65

- Leerseite -



Figur 1